

PRODUCTION OF COPOLYMER

Publication number: JP5007492

Publication date: 1993-01-19

Inventor: YAMANE TSUNEO; UEDA SHUNSAKU; IMAGAWA SHIGEKI; TOKUNAGA YOSHIHARU; TAWARA TORAIICHI; YASAKA HIROYUKI; URAGAMI SADAJI

Applicant: MITSUBISHI GAS CHEMICAL CO

Classification:

- international: **C12P7/62**; C12R1/05; C12R1/065; C12R1/07; C12R1/15; C12R1/365; C12R1/37; C12R1/38; C12R1/41; **C12P7/62**; (IPC1-7): C12P7/62

- european:

Application number: JP19910257030 19910909

Priority number(s): JP19910257030 19910909; JP19900242605 19900914

Report a data error here

Abstract of JP5007492

PURPOSE:To massively produce the copolymer of D-3-hydroxybutyrate and D-3-hydroxypivalate at a low cost by culturing a poly-3-hydroxybutyrate- producing bacterium under specific conditions to accumulate the copolymer in the cells thereof. **CONSTITUTION:**A bacterium (e.g. methylobacterium fujisawaens NCIB 12417) having an ability to produce poly-3-hydroxybutyrate is mainly multiplied in the first stage. The multiplied bacterium is subsequently cultured at 30 deg.C for two days with reciprocatively shaking, while being brought into contact with a mixture of a 3-7C primary alcohol (e.g. n-amyl alcohol) and a carbon source (e.g. glucose) capable of being used as an energy source for the bacterium or with the 3-7C primary alcohol, and the cells of the cultured bacterium are collected by a centrifugal method, dried at 60 deg.C and subsequently extracted with chloroform, etc., to provide the objective copolymer of D-3-hydroxybutyrate and D-3-hydroxypivalate which has excellent bio-degradability and bio- compatibility and which is useful for producing operation yarns, etc.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-7492

(43) 公開日 平成5年(1993)1月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62		8114-4B		
// (C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:05)				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-257030	(71) 出願人	000004466 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
(22) 出願日	平成3年(1991)9月9日	(72) 発明者	山根 恒夫 愛知県名古屋市千種区若水3丁目22番地の1
(31) 優先権主張番号	特願平2-242605	(72) 発明者	上田 俊策 愛知県豊田市三崎町社13番地の8
(32) 優先日	平2(1990)9月14日	(72) 発明者	今川 茂樹 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱 瓦斯化学株式会社新潟研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共重合体の製造法

(57) 【要約】

【構成】ポリ-3-ヒドロキシブチレートを生産する能力を有する細菌を、前段で該細菌を主として増殖させ、後段で該細菌が利用することの出来る炭素源と3~7の第一アルコールとの混合物に接触させることにより、菌体内にD-3-ヒドロキシブチレートおよびD-3-ヒドロキシパリレートからなる共重合体を合成蓄積させる。

【効果】D-3-ヒドロキシブチレートおよびD-3-ヒドロキシパリレートからなる共重合体を大量かつ安価に生産することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ポリ-3-ヒドロキシブチレートを生産する能力を有する細菌を、前段で該菌体を主として増殖させ、後段で該細菌がエネルギー源とすることの出来る炭素源と炭素数3～7の第一アルコールとの混合物または炭素数3～7の第一アルコールに接触させることにより、該菌体内にD-3-ヒドロキシブチレートおよびD-3-ヒドロキシパリレートからなる共重合体を合成蓄積させ、この共重合体を当該菌体から取得することを特徴とする共重合体の製造法。

【請求項2】後段で用いる炭素数3～7の第一アルコールとしてn-アミルアルコールもしくはその誘導体を用いることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はD-3-ヒドロキシブチレート（以下B成分と記す）およびD-3-ヒドロキシパリレート（以下V成分と記す）を含有する共重合体の製造法に関するものである。

【0002】

【従来技術、発明が解決しようとする課題】ポリ-3-ヒドロキシブチレート（以下PHBと記す）は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に生成、蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農業を徐々に放出する除放射性システムなどの多方面への応用が永年にわたり期待されてきた。特に、近年、合成プラスチックが環境汚染や資源環境の観点から深刻な社会問題になるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。しかしながら、PHBは、融点が熱分解温度に近く、かつ脆いという欠点から実用化は困難である。

【0003】そこで、これらの問題を解決すべく検討が行われ、融点が低下し、軟らかくなり加工性が改善されたB成分とV成分を含有する共重合体およびその製造法が報告されている（特開昭57-15093公報、特開昭59-220192公報、特開昭63-269989公報、特開平1-69622公報）。これらの公報には、*Alcaligenes eutrophus* の菌体を窒素あるいはリンを制限するなどの方法による増殖制限条件下で、グルコース-プロピオン酸、グルコース-イソ酪酸、グルコース-吉草酸との混合物に接触させることにより共重合体を製造する方法が記載されているが、これらの方法は生産コストが高いなど工業的生産には不十分である。

【0004】そこで本発明者らは、B成分とV成分を含有する共重合体をより安定に、大量にかつ安価に製造する方法を鋭意研究し、本発明に到達した。

【0005】

【課題を解決するための手段、作用】本発明者らは、P

HBを生産する能力を有する細菌を用いて、B成分とV成分を含有する共重合体を蓄積させる方法を鋭意検討したところ、これらの細菌を増殖制限条件下で当該細菌がエネルギー源とすることの出来る炭素源と炭素数3～7の第一アルコールとの混合物または炭素数3～7の第一アルコールに接触させることにより菌体中にB成分とV成分を含有する共重合体を蓄積させることが出来ることを見だし、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明はPHBを生産する能力を有する細菌を前段では、該菌体を主として増殖させ、後段では増殖制限条件下にて当該細菌がエネルギー源とすることの出来る炭素源と炭素数3～7の第一アルコールとの混合物または炭素数3～7の第一アルコールに接触させることにより、該菌体中にD-3-ヒドロキシブチレートおよびD-3-ヒドロキシパリレートを含有する共重合体を合成蓄積させ、この共重合体を当該菌体から取得することを特徴とする共重合体の製造法である。本発明において、共重合体に含有されるB成分およびV成分は、それぞれ次の式で示される。すなわち、

10 B成分 : $-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}-$

V成分 : $-\text{OCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CO}-$

【0007】本発明に使用される細菌は、PHBを生産する能力を有する細菌であればよく、たとえば、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属、アチオロージウム (*Athiorhodium*) 属、アゾバクター (*Azotobacter*) 属、スピリリウム (*Spirillum*) 属、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、ハイホミクロビウム (*Hyphomicrobium*) 属、アンシロバクター (*Ancylobacter*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アゾバクター (*Azotobacter*) 属などが数多く存在する。代表的な菌種としては、シュードモナス プチダ、シュードモナス レモイグネイ、シュードモナス オレオボラン

30 ム、シュードモナスファシリス、アルカリゲネス ユウトロファス、アルカリゲネス ファセカリス、アルカリゲネス ルーランティ、アルカリゲネス ラツス、アルカリゲネス アクアマリヌス、アゾバクター クロオコッカス、アゾバクター ビネランディ、メチロバクテリウム エクストルクエンシス、メチロバクテリウム オルガノフィラム、メチロバクテリウム メソフィリカム、メチロバクテリウム ロウディナム、メチロバクテリウム ラジオトレランス、メチロバクテリウム フジサワエンシス、メチロバクテリウム ロオディシアナム、メチロバクテリウム ザットマニイ、ハイホミクロビウム プルガレ、ハイホミクロビウム アエスティアリイ、ハイホミクロビウム ホーランドフィカム、ハイホ

ミクロビウム ファシリシ、ハイホミクロビウム ザバルジニ、ハイホミクロビウム メチロバラム、アンシロバクター アキュアティクス、キサントバクター オートトロフィカス、キサントバクター フラバス、パラコッカス デニトリフィカンス、パラコッカス アルカリフィラス、パラコッカス アミノフィラス、パラコッカス アミノボランス、パラコッカス コクリー、リゾビウム メリロティ、リゾビウム レグニノサラム、ブラディリゾビウム ジャポニカム、パチルス メガテリウム、ノカルディア ルシダ、コリネバクテリウム ジオキシダンス、コリネバクテリウム ヒドロカルボキダンス、アゾトバクター クロオコッカム、アゾトバクター ビネランディーなどがある。

【0008】本発明において、共重合体を含む菌体は、主として菌体を製造することを目的とする第一工程（前段）と、主として共重合体を菌体内に生成蓄積させることを目的とする第二工程（後段）との2工程により得ることが出来る。第一工程（前段）の菌体の製造は、細菌を増殖させるための通常の培養法で行われ、使用する細菌が増殖し得る培地および培養条件が用いられる。培地として用いる炭素源としては、使用する細菌が資化する物質であれば特に制限はないが、グルコース、シュクロース、などの糖類、グリセロール、ソルビトール、マンニトール等の糖アルコール、コハク酸、クエン酸、酢酸などの有機酸、エタノール、メタノール、プロパノールなどのアルコール類、酵母エキス、糖蜜、コーンステープリカー、麦芽エキスなどの炭素化合物および有機窒素を含有する天然物質を用いることが出来る。窒素源としては、使用する細菌が資化する物質であれば特に制限はなく、アンモニア、尿素、硝酸あるいは酵母エキス、麦芽エキス、などの有機窒素含有物が用いられる。その他、リン酸塩、カリウム塩、ナトリウム塩、硝酸塩およびマグネシウム、鉄、カルシウム、亜鉛、マンガ、ン、コバルト、銅、モリブデン等の金属塩が用いられる。培養条件は、使用する細菌により異なるが、一般的には、温度は20～40℃、好ましくは25～35℃が、又、pHは、6～10、好ましくは6.5～9.5が用いられる。このような条件で好氣的に培養されるが、そのために空気、酸素を通気しかつ、酸素を培養液に有効に溶解させるために必要に応じて攪拌する。一般的には培養液中の溶存酸素濃度は1ppm以上が好ましい。これらの条件をはずして培養した場合には、細菌の増殖は相対的に悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

【0009】第一工程で、細菌を培養し、菌体を得た後、第二工程に移行する。第二工程では、細菌の増殖を抑制する条件下で当該細菌がエネルギー源とすることの出来る炭素源と炭素数3～7の第一アルコールを添加し、菌体中に共重合体を合成蓄積させる。細菌の増殖を抑制する方法としては、培養液中の窒素、リン酸などの

炭素源以外の培地成分を制限する方法が用いられる。そのためには、第一工程で用いる培地を定め、炭素源を十分供給し、温度、pHを調節しながら培養を行い、炭素源以外の培地成分の欠乏により細菌の増殖が低下し、さらに停止した後に、第二工程に移行する方法が用いられる。あるいは、第一工程の培養液から細菌菌体を、濾過あるいは固液分離手段により菌体を分離し回収し、この菌体を新たな培地に懸濁し、第二工程を行う方法がある。いずれの方法においても第二工程の培地組成を除く培養条件は、第一工程の培養条件と同一でよく、又、細菌によっては異ならせてもよい。第二工程に用いる当該細菌がエネルギー源とすることの出来る炭素源としては、第一工程で用いる炭素源と同一のもののほかに、たとえ細菌が資化し増殖できない炭素源でも細菌がエネルギー源として利用できる炭素源であれば用いることが出来る。第二工程に用いる炭素数3～7の第一アルコールとしては、n-プロパノール、n-アミルアルコール（n-ペンチルアルコール）などおよびそれらの誘導体がある。

【0010】使用する細菌が、この炭素数3～7の第一アルコールをエネルギー源として利用できる場合は、炭素源として炭素数3～7の第一アルコールのみを用いることもできる。また、エネルギー源とすることの出来る炭素源および炭素数3～7の第一アルコールの使用量は、共重合体を菌体内に生成蓄積させることが出来る量であればよく、使用する細菌及び共重合体のB成分とV成分の所望のモル比等により異なるが、それらの合計の濃度として、培養液1Lあたり0.1～20g程度、好ましくは0.2～10g程度とされる。

【0011】なお、エネルギー源として、利用できる炭素源と炭素数3～7の第一アルコールの割合を変化させることにより、共重合体中のB成分とV成分のモル比を任意に変化させることが可能であり、一般的に炭素数3～7の第一アルコールの割合を高めることによりV成分のモル比を大きくすることが出来る。共重合体を含む菌体から共重合体を取得する方法としては、クロロホルム、ジクロロホルム、次亜鉛素酸ソーダ等による溶媒抽出法あるいは、酵素による菌体の分解法など従来の方法が用いられる。

【0012】

【実施例】本発明を実施例により具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

メチロバクテリウム フジサワエンス NCIB 12417、パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441、アルカリゲネス ユウトロファス ATCC 17687、アルカリゲネス ユウトロファス NCIB 11597 およびシュードモナス レモイグネイ ATCC 17989 を用いて共重合体の合成を行った。

第一工程

純水 1 L 当り、ポリペプトン 5 g、酵母エキス 5 g、グルコース 5 g を溶解し、pHが7.0 に調整された液50 mL を坂口フラスコに入れ、120 ℃で20分間殺菌し、これを培地とした。これに、前記と同様な培地を用いて30℃で24時間前培養した各菌株の培養液をそれぞれ1容量%接種し、30℃で往復振とう培養を2日間行った。培養液を10,000 × gで10分間遠心分離し、菌体を集菌した。

【0013】第二工程

純水 1 L 当り、K₂HPO₄ 1.6 g、Na₂HPO₄ 2.4 g、MgSO₄・7H₂O 0.2 g、CuSO₄・5H₂O 0.3 mg、MnCl₂・4H₂O 3 mg、FeC₆H₅O₂・XH₂O 18 mg、CaCl₂・2H₂O 18 mg、ZnSO₄・7H₂O 3 mgを溶解し、pHが7.2 に調節され、120 ℃で20分間殺菌した溶液25 mL づつを用いて、前段培養で得られた菌体を各々2回洗浄し、さらに各々の菌体をそれぞれ上記組成の溶液50 mL に懸濁し、これにn-アミルアルコール0.15 mL (0.3 容量%) を添加し、30℃で往復振とう培養を行った。後段培養を50時間行った後、遠心分離機で集菌した後、2回純水で洗浄した後、菌体を60℃で乾燥した。約40mgの乾燥菌体をスクリュウキャップ*20

*付き試験管に入れ、クロロホルム1 mL、内部標準入りメタノール-硫酸溶液 (内部標準:安息香酸184mg /100 mL、硫酸3.5 容量%) 1 mLを加え、120 ℃で90分間加熱処理し、菌体に含まれるポリマーの分解およびメチルエステル化を行った。反応終了後純水を0.5 mL加え、激しく攪拌した後、遠心分離を行い有機層を得た。この有機層をガスクロマトグラフィーで分析することにより、B成分含量およびV成分含量を求め、その合計から共重合体の含量さらに共重合体中のV成分の割合を算出した。また、第二工程の培養終了時の培養液に含まれるn-アミルアルコール濃度およびpHを調べた。結果を表1に示す。

【0014】ガスクロマトグラフィー分析条件

島津ガスクロGC-7AG

カラム: Reoplex 400 chromosorb G

AW-DMCS 10% (60~80 mesh)

カラム濃度: 160 ℃

入口濃度: 250 ℃

【0015】【表1】

菌株	共重合体含量 (重量%)	V成分の割合 (モル%)	培養終了後の培養液	
			残存基質* (重量%)	pH
A*	12.3	2.4	0.12	5.0
B*	8.7	76.4	0.14	5.0
C*	15.0	77.5	0.0	6.7
D*	16.8	29.9	0.0	6.7
E*	3.2	0	0.22	6.8

* A: メチロバクテリウム フジサワエンス NCIB 12417

B: パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441

C: アルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697

D: アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597

E: シュードモナス レモイグネイ ATCC 17989

** n-アミルアルコール

【0016】実施例2

第二工程におけるn-アミルアルコールの添加量を以下のように変更した以外は、実施例1と同様にして共重合体の合成を行った。n-アミルアルコールを0.025 mL (0.05容量%) を添加し、30℃で往復振とう培養を50時間行った。12時間、25時間および37時間後に、培養液中に含まれるn-アミルアルコール濃度を測定し、0.05容

量%になるようにn-アミルアルコールを添加した。なお、各培養におけるn-アミルアルコールの添加量は、メチロバクテリウム フジサワエンス NCIB 12417 の場合、25時間後0.01 mL、37時間後に0.005 mL、パラコッカス デニトリフィカンス ATCC17441 およびアルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697 の場合12時間、25時間、37時間後にそれぞれ0.025 mL、アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597 の場合、12時間、25時間および37時間後にそれぞれ0.015 mL、およびシュードモナス レモイグネイATCC 17989 の場合、37時間後に0.01 mL であった。結果を表2に示す。

【0017】【表2】

菌株	基質添* 加総量 (容量%)	共重合 体含量 (重量%)	V成分 の割合 (モル%)	培養終了後の培養液	
				残存基質* (容量%)	pH
A*	0.08	9.2	9.7	0.05	6.6
B*	0.20	24.2	88.1	0.0	6.6

7	8
C*	0.20 12.8 56.9 0.02 6.7
D*	0.14 7.0 47.9 0.05 6.6
E*	0.07 46.8 59.8 0.03 6.7

* A:メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417
 B:パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441
 C:アルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697
 D:アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597
 E:シュードモナス レモイグネイ ATCC 17989
 ** いずれもn-アミルアルコール

*【0018】実施例3

第二工程における炭素源としてグルコース0.25g (0.5重量%) およびn-アミルアルコール0.15 mL (0.3容量%)を添加した以外は、実施例1と同様にして共重合体の合成を行った。結果を表3に示す。

【0019】

*10 【表3】

表3

菌株	共重合 体含量 (重量%)	V成分 の割合 (モル%)	培養終了後の培養液		
			n-アミル アルコール (容量%)	グルコース (重量%)	pH
A*	12.4	0.6	0.0	0.37	4.7
B*	13.3	74.1	0.13	0.43	5.0
C*	9.9	62.2	0.01	0.20	5.5
D*	1.2	31.8	0.24	0.03	6.6
E*	35.6	48.2	0.23	0.26	6.7

* A:メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417
 B:パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441
 C:アルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697
 D:アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597
 E:シュードモナス レモイグネイ ATCC 17989

【0020】実施例4

第二工程におけるn-アミルアルコールの添加量を以下のように変更した以外は、実施例3と同様にして共重合体の合成を行った。グルコース0.25g (0.5重量%) およびn-アミルアルコールを0.025 (0.05容量%)を添加し、30℃で往復振とう培養を50時間行った。12時間、25時間および37時間後に、培養液中に含まれるn-アミルアルコール濃度を測定し、0.05容量%になるようにn-アミルアルコールを添加した。なお、各培養における※

※n-アミルアルコールの添加量は、メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417の場合、25時間後に0.01 mL および37時間後に0.005 mL、パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441の場合、12時間後、25時間後および37時間後にそれぞれ0.025 mL、アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 17697 の場合、12時間に0.015 mL、25時間および37時間後にそれぞれ0.025 mL、アグカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597の場合、12時間後に0.005 mL、25時間後および37時間後にそれぞれ0.015 mL、およびシュードモナス レモイグネイ ATCC 17989 の場合、37時間後に0.015 mLであった。結果を表4に示す。

【0021】

【表4】

表4

菌株	n-アミル アルコール 添加総量 (容量%)	共重合 体含量 (重量%)	V成分 の割合 (モル%)	培養終了後の培養液		
				n-アミル アルコール (容量%)	グルコース (重量%)	pH
A*	0.08	12.0	12.0	0.05	0.46	6.6
B*	0.20	34.1	50.1	0.0	0.26	6.0
C*	0.18	12.1	55.9	0.0	0.19	5.1
D*	0.12	16.8	29.9	0.05	0.09	6.6
E*	0.08	17.4	47.4	0.04	0.23	6.7

* A:メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417
 B:パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441
 C:アルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697

D:アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597
 E:シュードモナス レモイグネイ ATCC 17989

【0022】実施例5

アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597 およびシ

ユードモナス レモイグネイ ATCC 17989 を用いて共重合体の合成を行った。第二工程においてn-アミルアルコールの添加量を0.025 mL (0.05容量%)とした以外は、実施例3と同様にして共重合体の合成を行った。結*

*果を表5に示す。

【0023】

【表5】

表5

菌株	共重合体含量 (重量%)	H成分の割合 (モル%)
D*	33.4	15
E*	36.8	26

* D: アルカリゲナス ユウトロファス NCIB 11597

E: シュードモナス レモイグネイ ATCC 17989

【0024】実施例6

アルカリゲナス ユウトロファス ATCC 17697 を用いて共重合体の合成を行った。第二工程でのn-アミルアルコールの濃度の影響を調べた。第一工程は、実施例3と同様に行い、第二工程はn-アミルアルコール濃度とし※

※0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 容量%とした以外は、実施例3と同様に行い共重合体を合成した。なお、第二工程培養終了後の培養液のpHも調べた。結果を表6に示す。

【0025】

【表6】

表6

n-アミルアルコール 添加量 (容量%)	共重合体含量 (重量%)	V成分の割合 (モル%)	培養終了後のpH
0	0.9	0	6.7
0.05	1.4	58	6.6
0.1	4.9	60	6.6
0.2	11.4	64	6.5
0.3	17.5	68	6.6
0.4	4.8	90	6.5
0.5	1.0	51	5.7

【0026】実施例7

メチロバクテリウム エクストルクエンシス K (微工研寄 第8395) (この菌株は、プロトモナス エクストルクエンシスとして寄託されているが、インターナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・バクテリオロジー、第35巻、第209 頁、1985年によりプロトモナス エクストルクエンシスに、メチロバクテリウム エクストルクエンシスに変更になったため、メチロバクテリウム エクストルクエンシスと記す) を用いて共重合体の合成を行った。

★【0027】第二工程における炭素源として①グルコース0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%) 2 回 (最初および培養25時間後)、②フラクトース0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025mL (0.05容量%)、③シュクロース 0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%) をそれぞれ用いた以外は、実施例3と同様に行った。結果を表7に示す。

【0028】

【表7】

表7

炭素源	共重合体含量 (重量%)	V成分の割合 (モル%)	培養終了後のpH
①*	13.3	78.6	5.5
②*	31.6	43.0	5.9
③*	8.7	82.3	5.7
④*	13.4	58.6	4.6

* 実施例7の文章中に記載

【0029】実施例8

パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441を用いて共重合体の合成を行った。第二工程における炭素源として①グルコース0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%) 2 回 (最初および

培養25時間後) ②フラクトース0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%) ③シュクロース0.25 g (0.5 重量%) およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%) をそれぞれ用いた以外は、実施例3と同様に行った。結果を表8に示す。

【0030】

【表8】

表8			
炭素源	共重合体含量 (重量%)	V成分の割合 (モル比)	培養終了後のpH
①*	49.1	47.1	6.5
②*	40.9	68.1	6.5
③*	49.8	43.5	6.4

* 実施例8の文章中に記載

【0031】実施例9

メチロバクテリウム エクストルクエンシス K (微工研寄第8395)、メチロバクテリウム オルガノフィラム A TCC 27886、メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417、ハイボミクロビウム メチロボラム IF0 14180、キサントバクテリウム オートトロフィカス DSM 432およびパラコッカス デニトリフィカンスATCC 17441を用いて共重合体の合成を行った。

【0032】第一工程

純粋1L 当り、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g、 KH_2PO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 3.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、酵母エキス 0.2g、 NaHCO_3 0.3g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 18mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mgおよびメタノール10 mLを溶解し、pHが7.2に調整された液50 mLを坂口フラスコに入れ、120℃で20分間殺菌し、これを培地とした。これに前記と同様な培地を用いて30℃で3日間前培養した各菌株の培養液をそれぞれ1容量%接種し、30℃で往復振とう培養を2日間行った。培養液を10,000×gで10分間遠心分離し、菌体を集菌した。

*

表9

菌株	共重合体含量 (重量%)	V成分の割合 (モル%)	培養終了後のpH
A	17.7	38	6.7
B	53.2	71	6.6
F	29.7	32	5.8
G	7.5	17	5.0
H	12.5	3	4.1
I	16.2	12	6.5

* A:メチロバクテリウム フジサワエンシス NCIB 12417
B:パラコッカス デニトリフィカンス ATCC 17441
F:メチロバクテリウム エクストルクエンシス K (微工研寄第8395)
G:メチロバクテリウム オルガノフィラム ATCC 27886
H:ハイボミクロビウム メチロボラム IF0 14180
I:キサントバクテリウム オートトロフィカス DSM 432

【0034】実施例10

*第二工程

10 純粋1L 当り、 K_2HPO_4 1.6g、 Na_2HPO_4 2.4g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 18mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mgを溶解し、pHが7.2に調節され、120℃で20分間殺菌した溶液25 mLづつを用いて、第一工程で得られた菌体を各々2回洗浄し、さらに各々の菌体をそれぞれ上記組成の溶液50mLに懸濁し、これにメタノール0.15mL (0.3容量%)およびn-アミルアルコール0.025 mL (0.05容量%)を添加し、30℃で往復振とう培養を行った。振とう培養を25時間行った後、再度メタノール0.15mL およびn-アミルアルコール 0.025 mLを添加し、さらに25時間往復振とう培養を行った。第二工程の培養を50時間行った後、菌体中に含まれる共重合体の含量さらに共重合体中のV成分の割合を実施例1と同様な方法で求めた。また、第二工程終了後の培養液のpHも調べた。結果を表9に示す。

【0033】

【表9】

40 メチロバクテリウム エクストルクエンシス Kを用いて、共重合体の合成を行った。第二工程でのn-アミルアルコール添加量の影響を調べた。第一工程は、実施例1と同様に行い、第二工程は、n-アミルアルコール濃度として、0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10容量%とし、25時間後に再度同量のn-アミルアルコールを添加した以外は、実施例1と同様に行い共重合体を合成した。結果を表10に示す。

【0035】

【表10】

表10

n-アミルアルコール	共重合体含量	V成分の割合	培養終了後のpH
------------	--------	--------	----------

13	14
濃度 (容量%)	(重量%) (モル%)
0	24.4 0 6.8
0.02	17.4 3 6.5
0.04	23.5 33 6.6
0.06	29.7 32 5.8
0.08	28.7 37 5.3
0.10	25.9 29 4.9

【0036】実施例11

メチロバクテリウム エクストルクエンシス Kを用いて 10
共重合体の合成を行った。

第一工程

純粋 1L 当り、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g、 K_2HPO_4 1.4g、 Na_2HPO_4 3.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、酵母エキス 0.2g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mgおよびメタノール12mLを溶解し、pHが7.2 に調整された液200 Lを1L 容三角フラスコに入れ、120 °Cで20分間殺菌し、これを培地とした。これに前記と同様な培地を用いて30 °Cで3日間前培養した当該細菌の培養液を1容量%接種し、30°Cで回転振とう培養を54時間行い、対数増殖期が終了した後、培養液を10,000 Xgで10分間遠心分離し、菌体を集菌した。

【0037】第二工程

純水 1L 当り、 K_2HPO_4 1.6g、 Na_2HPO_4 2.4g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3mg、 $\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 18mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}$

20 18mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mgを溶解し、pHが7.2 に調節され、120 °Cで20分間殺菌した溶液100 mLを用いて、第一工程で得られた菌体を2 回洗浄し、さらに上記組成の溶液200 mLに懸濁し、これにn-アミルアルコールを1g (0.5 重量%) およびメタノールを1g (0.5 重量%) 添加し、30°Cで回転振とう培養を48時間行った。培養期間中にメタノール濃度を測定し、0.25重量%以下になった場合、メタノールを1g (0.25重量%相当) 添加した。なお、途中の添加回数は、3回であった。培養終了後、菌体中に含まれる共重合体、B成分およびV成分の含量および共重合体中のV成分の割合を実施例1 と同様な方法で求めた。その結果、共重合体の含量は31.5重量%、B成分の含量は14.1重量%、V成分の含量は17.4重量%であり、共重合体中のV成分の割合は、51モル%であった。

【0038】

【発明の効果】本発明によりD-3-ヒドロキシブチレートおよびD-3-ヒドロキシバリレートからなる共重合体を大量かつ安価に生産することが出来る。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:065)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:41)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:07)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:365)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:37)				

(72)発明者 徳永 義晴
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72)発明者 田原 寅一
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(9)

特開平5-7492

(72)発明者 家坂 博幸

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72)発明者 浦上 貞治

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 三
菱瓦斯化学株式会社本社内